



TITLE:

# キノプロテインの構造と電子移動 およびそのバイオ電極デバイスへ の応用

AUTHOR(S):

加納, 健司

---

CITATION:

加納, 健司. キノプロテインの構造と電子移動およびそのバイオ電極デバイスへの応用. 2006

ISSUE DATE:

2006-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85075>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

キノプロテインの構造と電子移動  
およびそのバイオ電極デバイスへの応用

(課題番号 15380082)

平成15年度～平成17年度 科学研究費補助金

(基盤研究 (B))

研究成果報告書

2006年3月



研究代表者 加納 健 司

(京都大学大学院農学研究科 教授)



(課題番号 15380082)

平成15年度～平成17年度 科学研究費補助金

(基盤研究 (B))

# 研究成果報告書

2006 年 3 月

研究代表者 加納 健 司

(京都大学大学院農学研究科 教授)

## 1 緒言

キノプロテインは、PQQ(ピロロキニリンキノン)等のキノンコファクターを補酵素とする酸化還元酵素である。これまでに発見された5種のキノンコファクターのうち、PQQを除く4種はすべて“ビルドイン補酵素”として、翻訳後修飾によりタンパク質ポリペプチド鎖中にアミノ酸残基誘導体として形成される。分子内にキノンコファクターとともにヘムを有するキノヘモプロテインも多く発見されている。酢酸菌、パラコッカス属菌、シュドモナス属菌などの好氣的グラム陰性細菌は、アルコールやアミンなどをエネルギー源および炭素、窒素源とすることができ、その初発酵素の多くはキノプロテインである。また、キノプロテインは高等生物にも存在する。

本研究では、こうしたキノ(ヘモ)プロテインに関して、生物物理化学的視点から、分子内・分子間電子移動過程、キノンコファクターの電子状態と触媒活性の関係、翻訳後修飾過程等の解明等を目指した。一方、キノ(ヘモ)プロテインの多くは他の酸化還元酵素に比べ、触媒活性が高いことから、そのキノ(ヘモ)プロテイン反応系と電気化学系との共役を利用して、バイオ電池、環境浄化を含めたバイオリアクタの構築を目指した。

本研究での主なテーマは、(A)新規キノプロテイン候補として考えられている放線菌由来のヒスタミン脱水素酵素の構造決定、(B)キノ(ヘモ)プロテインと他の酸化還元タンパク質間での分子間電子移動と細胞内電子移動ネットワークの解明、(C)キノヘモプロテインを対象とした分子内電子移動の解明、(D)前駆体キノヘモプロテインの酸化還元反応とその活性化機構の解明に焦点を絞り、電気化学法、分光光学法等を用いて生物物理化学視点から検討することを計画した。また、こうした知見をもとに、(F)キノヘモプロテインのヘムを分子内メディエータとする電極との直接電子移動反応系、ならびに生理的タンパク質間電子移動反応を利用する直接電子移動反応系の実現と、それを利用したバイオ電極デバイスの構築を目指した。さらにこれを、(G)バイオ電池といった応用的視点でも研究展開することを目的とした。

## 2 研究組織

研究代表者 加納健司 10152828

(平成15年4月～平成17年3月 京都大学大学院農学研究科助教授)

(平成17年4月～平成18年3月 京都大学大学院農学研究科教授)

研究協力者 池田篤治 40026422

(平成15年4月～平成17年3月 京都大学大学院農学研究科教授)

研究協力者 辻村清也 30362429

(平成15年4月～平成18年3月 京都大学大学院農学研究科助手)

## 3 交付決定額 (配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	10,100	0	10,100
平成16年度	1,700	0	1,700
平成17年度	1,700	0	1,700
総計	13,500	0	13,500

## 4 研究成果

### 4.1 研究成果の要約

#### ① 放線菌類のヒスタミン脱水素酵素(HmDH)の構造解析と細胞内電子移動特性

HmDH のクローニング (Degenerated PCR と TAIL-PCR), シーケンス, 活性中心の化学分析を行い, HmDH の一次構造解析に成功した. HmDH の活性中心はキノンであるとの報告もされていたが, 本研究の結果, HmDH は 6-S-cyteinyl-FMN および 4Fe-4S クラスターを分子内酸化還元中心とする非常にまれな酵素であることがわかった. 類似酵素の場合, その生理的電子受容体は electron transfer flavoprotein (ETF) であるとされているが, HmDH のそれは, ETF ではない可能性が示唆された.

一方, HmDH の大腸菌での大量発現系で, 活性種の発現率を, 培養条件を検討することにより, 当初のほぼ 100%にまで向上させた. これは, 6-S-cyteinyl-FMN および 4Fe-4S クラスターを有する酵素としては初めて達成された結果である. さらに, 部位特変異を試み, ヒスタミンに対する基質選択性の向上に成功した.

本酵素の 6-S-cyteinyl-FMN および 4Fe-4S クラスターの酸化還元電位を, それぞれ, 無隔膜バルク全電解分光分析法と酸化インジウム電極の利用により, 初めて評価することに成功した.

また基質による還元では, 中性ではモノマー当たり2電子還元されるのに対して, pH 9.5 以上では1電子還元されることを, 完全嫌気条件下での基質滴定実験により, 初めて見出した. さらに, 基質による還元反応をストップフロー法により追跡し, その速度解析を行った. 酵素活性の pH 依存性および, 本酵素の基質阻害を, 分子内電子移動の平衡論というまったく新しい概念で説明できる可能性を示した.

#### ② キノヘモプロテインの直接電子移動系電極反応

脱窒菌が産生するキノヘモプロテイン アミン脱水素酵素(QH-AmDH)と電子受容体電子移動反応に及ぼすイオン強度の効果を検討した. 電気分析法による平衡論的解析と, ストップフロー法による速度論的解析の結果, QH-AmDH の電子供与部位は酸化還元電位的に一番下流の Met-heme *c* である可能性が示唆され, その近傍の正電荷が, 電子移動反応に大きく寄与することがわかった. この知見に基づき, 電極を負電荷修飾し, QH-AmDH の電極での直接電子移動反応の実現を試みたが, 現時点では, 観測に成功していない. 今後, さらに, 電極の微細電荷の調整が必要であると考えている.

QH-AmDH の不活性型の単離と活性化に成功した. この化学分析結果をより, 不活性体ではキノコファクタがオキシム体になっていることを明らかにした. さらに QH-AmDH はヒドロキシルアミンでオキシムになり, その還元により活性化できることを証明した.

一方, 酢酸菌由来のキノヘモプロテイン アルコール脱水素酵素(QH-ADH)の直接電子移動型電極触媒反応についても電気化学的解析を行った. その結果, 4つのヘムのうち, 酸化還元電位的に下流から2番目の heme *c* が電子供与サイトとして機能すると結論した. この考えに基づき, はじめて電流-電圧曲線の理論的解析に成功した.

#### ③ バイオ電池への展開

これら脱水素酵素反応系をアノード系触媒とし, またビリルビンオキシダーゼ触媒のカソード極と組み合わせたバイオ電池の基本特性の評価を行った. 電流密度的には, 実用を視野に入れることができるまで向上させることに成功した.

これら脱水素酵素反応系, および他のキノプロテインあるいはNAD依存性酵素をアノード系触媒とし, またビリルビンオキシダーゼ(BOD)触媒のカソード極と組み合わせたバイオ電池の基本特性の評価を行った. BOD触媒に関しては, 直接電子移動反応が電極基材特性に大きく依存することがわかり, 吸着量と触媒能との関係を論じた. これらの反応系の基礎検討をもとに, 電流密度的には, 実用を視野に入れることができるまで向上させることに成功した. また, バイオ電池の試作も行った.



## 5 研究発表

### 5. 1 原著論文

- 1) Redox Properties of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*  
Nobutaka Fujieda, Megumi Mori, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1647** (1/2), 289–296 (2003).
- 2) Structure of the Phenylhydrazine Adduct of the Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* at 1.7 Å Resolution  
Saumen Datta, Tokuji Ikeda, Kenji Kano, and F. Scott Mathews  
*Acta Crystallogr. D*, **59** (9), 1551–1556, (2003).
- 3) Bilirubin Oxidase and  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  Modified Electrode Allowing Diffusion-controlled Reduction of  $\text{O}_2$  to Water at pH 7.0  
Takaaki Nakagawa, Seiya Tsujimura, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Chem. Lett.*, **32** (1), 54–55 (2003).
- 4) Mediated Bioelectrocatalytic  $\text{O}_2$  Reduction to Water at Highly Positive Electrode Potentials Near Neutral pH  
Seiya Tsujimura, Masami Kawaharada, Takaaki Nakagawa, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Electrochem. Commun.*, **5** (2), 138–141 (2003).
- 5) Diaphorase/Naphthoquinone Derivative-modified Electrode as an Anode for Diffusion-Controlled Oxidation of NADH in Electrochemical Cells  
Atsushi Sato, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Chem. Lett.*, **32** (10), 880–881 (2003).
- 6) Novel Utilization of Impedance Measurement for Electrochemical Biosensing Aiming at Elimination of Influence by Interference Materials  
Susumu Kuwabata, Hidefumi Hasegawa, and Kenji Kano  
*Chem. Lett.*, **32** (1), 52–53 (2003).
- 7) DsbB Elicits a Red-shift of Bound Ubiquinone during the Catalysis of DsbA Oxidation.  
Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Nobutaka Fujieda, Kenji Kano, Hideto Miyoshi, and Koreaki Ito  
*J. Biol. Chem.*, **279** (8), 6761–6768 (2004); **Correction**
- 8) Kinetic Study of Direct Bioelectrocatalysis of Dioxygen Reduction with Bilirubin Oxidase at Carbon Electrodes  
Seiya Tsujimura, Takaaki Nakagawa, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Electrochemistry*, **72** (6), 437–439 (2004).
- 9) Separator-less One-compartment Bulk Electrolysis with a Small Auxiliary Electrode and Its Application to Spectroelectrochemistry  
Atsushi Kuriyama, Moriaki Arasaki, Nobutaka Fujieda, Seiya Tsujimura, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Electrochemistry*, **72** (7), 484–486 (2004).

- 10) Cholesterol Sensors Composed of Multienzyme Systems and Its Application to Flow-type Sensor  
Yoko Hayashi, Takaaki Shimasaki, Hidemi Takasu, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Chem. Sens.* (Supplement B), 66–67 (2004).
- 11) Fundamental Study for an Oxygen-insensitive Amperometric Glucose Sensor Using a Novel Glucose Dehydrogenase  
Shinki Kojima, Seiya Tsujimura, Kenji Kano, Tokuji Ikeda, Mika Sato, Hirokazu Sanada, Hironori Omura, and Sakayu Shimizu  
*Chem. Sens.* (Supplement B), 768–769 (2004).
- 12) Kinetic Study of Direct Electron Transfer between Enzyme and Carbon Electrodes  
Seiya Tsujimura, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Chem. Sens.* (Supplement B), 770–771 (2004).
- 13) Effect of pH on the Hydrogenase Activity of *Desulfovibrio vulgaris*  
Seiya Sakaguchi, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Electroanalysis*, **16** (13/14), 1166–1171 (2004).
- 14) Two Extracellular Proteins with Alkaline Peroxidase Activity, A Novel Cytochrome *c* and a Catalase-peroxidase, from *Bacillus* sp. No. 13  
Jun Ogawa, Woro Triarsi Sulistyaningdyah, Qing-Shan Li, Hiromi Tanaka, Sheng-Xue Xie, Kenji Kano, Tokuji Ikeda, Sakayu Shimizu  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1699** (1/2), 65–75 (2004).
- 15) 6-S-Cysteinyl Flavin Mononucleotide-containing Histamine Dehydrogenase from *Nocardioideis simplex*: Molecular Cloning, Sequencing, Over-expression and Characterization of Redox Centers of Enzyme  
Nobutaka Fujieda, Atsuko Satoh, Noriaki Tsuse, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Biochemistry*, **43** (33), 10800–10808 (2004).
- 16) Purification and Characterization of Aromatic Amine Dehydrogenase from *Alcaligenes xylosoxidans*  
Tetsuya Kondo, Emi Kondo, Hitomi Maki, Kyoden Yasumoto, Kazuyoshi Takagi, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (9), 1921–1928 (2004).
- 160) Bilirubin Oxidase in Multiple Layer Catalyzes Four-electron Reduction of Dioxygen to Water without Redox Mediators  
Seiya Tsujimura, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*J. Electroanal. Chem.*, **576** (1), 113–125 (2005).
- 17) Mediated Spectroelectrochemical Titration of Proteins for Redox Potential Measurements by a Separator-less One-compartment Bulk Electrolysis Method  
Seiya Tsujimura, Atsushi Kuriyama, Nobutaka Fujieda, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda  
*Anal. Biochem.*, **337** (2), 325–331 (2005).

- 18) Electron Transfer Reactions of Glucose Oxidase at Au(111) Electrodes Modified with Phenothiazine Derivatives  
Sayaka Nanjo, Kunikazu Ishii, Takeshi Ueki, Shin-ichiro Imabayashi, Masayoshi Watanabe, and Kenji Kano  
*Anal. Chem.*, **77** (13), 4142–4147 (2005).
- 19) Activation Process of [NiFe] Hydrogenase Elucidated by High Resolution X-ray Analyses: Conversion of the Ready to Unready State  
Hideaki Ogata, Shun Hirota, Asuka Nakahara, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Tatsuhisa Kato, Kenji Kano, and Yoshiki Higuchi  
*Structure*, **13** (11), 1635–1642, (2005).
- 20) Production of Completely Flavinylated Histamine Dehydrogenase, Unique Covalently Bound Flavin and Iron-sulfur Cluster Containing Enzyme of *Nocardioides simplex* in *Escherichia coli*, and its Properties  
Nobutaka Fujieda, Noriaki Tsuse, Atsuko Satoh, Tokuji Ikeda, and Kenji Kano  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (12), 2459–2462 (2005).
- 21) Novel FAD-dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-insensitive Glucose Biosensor  
Seiya Tsujimura, Shinki Kojima, Kenji Kano, Tokuji Ikeda, Mika Sato, Hirokazu Sanada, and Hironori Omura  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70** (3), 654–659 (2006).
- 21) *Escherichia coli*-catalyzed Bioelectrochemical Oxidation of Acetate in the Presence of Mediators  
Yung-Fu Wang, Sheng-Shung Cheng, Seiya Tsujimura, Tokuji Ikeda, and Kenji Kano  
*Bioelectrochemistry*, in press.
- 22) Potential-step Coulometry of D-Glucose Using Novel FAD-dependent Glucose Dehydrogenase  
Seiya Tsujimura, Shinki Kojima, Tokuji Ikeda, and Kenji Kano  
*Anal. Bioanal. Chem.*, in press.
- 23) Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Study on Adsorption of Bilirubin Oxidase as a Catalyst in Bioelectrocatalytic Reduction of Dioxygen  
Yuji Kamitaka, Seiya Tsujimura, Tokuji Ikeda, Kenji Kano  
*Electrochemistry*, in press.
- 24) Electron Transfer Kinetics between PQQ-dependent Soluble Glucose Dehydrogenase and Mediators  
Noriko Okumura, Tomohiko Abo, Seiya Tsujimura, Kenji Kano  
*Electrochemistry*, in press.
- 25) Reductive Activation and Characterization of Silent Form Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans*  
Nobutaka Fujieda, Megumi Mori, Tokuji Ikeda, and Kenji Kano, in preparation.



5. 2a 総説

- 1) Bioelectrocatalysis, Powerful Means of Connecting Electrochemistry to Biochemistry and Biotechnology  
Kenji Kano and Tokuji Ikeda  
*Electrochemistry*, **71** (2), 86–99 (2003).
- 2) バイオ燃料電池  
加納健司, 池田篤治  
電子材料, **42** (2), 38–43 (2003).
- 3) Bioelectrocatalysis-based Application of Quinoproteins and Quinoprotein-containing Bacterial Cells in Biosensors and Biofuel Cells  
Tokuji Ikeda and Kenji Kano  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1647** (1/2), 121–126 (2003).
- 4) 化学センサーの原理: バイオセンサー  
加納健司, 池田篤治  
ぶんせき, **2003** (10), 576–579.
- 5) バイオと電気化学の接点  
加納健司  
海洋化学研究, **16** (1), 27–29 (2003).
- 6) メディエータ型酵素触媒機能電極反応  
加納健司  
*Electrochemistry*, **71** (2), 138–141 (2003).
- 7) バイオ電池－生命力を電気エネルギーとして取り出す試み－  
加納健司, 池田篤治  
化学と教育, **51** (10), 620–623 (2003).
- 8) バイオ電池－しくみと応用  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
バイオサイエンスとインダストリー, **62** (3), 175–178 (2004).
- 9) バイオ電池の実用化が開く新しい可能性  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
*Material Stage*, **3** (12), 60–65 (2004).
- 10) バイオ電池のしくみ  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
ケミカルエンジニアリング, **49** (9), 717–722 (2004).
- 11) 進歩総説－生体物質の電気分析化学  
辻村清也, 加納健司  
ぶんせき, **2005** (2), 90–95.

- 12) サイクリックボルタンメトリー(1)ー可逆波  
加納健司, 大堺利行  
*Electrochemistry*, **73** (3), 220–224 (2005).
  - 13) サイクリックボルタンメトリー(2)ー準可逆波, 非可逆波  
大堺利行, 加納健司  
*Electrochemistry*, **73** (4), 310–313 (2005).
  - 14) バイオ電池の最新動向  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
月刊エコインダストリー, **10** (4), 5–11, (2005).
  - 15) 光合成呼吸電池の可能性  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
月刊エコインダストリー, **10** (4), 12–18, (2005).
  - 16) バイオ燃料電池  
辻村清也, 加納健司  
電池技術, **18**, 115–164 (2006).
5. 2b 著書
- B9) Bioelectrocatalysis  
Kenji Kano and Tokuji Ikeda  
“Interfacial Catalysis,” Ed. Alexandre George Volkov, Marcel Dekker, New York, pp. 461–491, 2003.
  - B10) 電気化学—標準電極電位, 式量電位  
垣内 隆, 加納健司, 小山宗孝  
“化学便覧 基礎編”, 改訂5版, 日本化学会編, 丸善, 東京, 第2巻, 第13章, 2節, 2項および 3項, pp. II-580 – II-593, 2004.
  - B11) 生命現象をはかる  
加納健司  
“はかってなんぼ 社会編”, 紀本岳志, 樋上 照男, 加納健司編, 丸善, pp. 149–159, 2004.
  - B12) バイオ電池の最新動向  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
“エコバイオエネルギーの最前線”, 植田充美, 近藤昭彦編, シーエムシー出版, 第7章エコ未来型電池—バイオ電池, 308–315, 2005.
- 光合成呼吸電池の可能性  
辻村清也, 加納健司, 池田篤治  
“エコバイオエネルギーの最前線”, 植田充美, 近藤昭彦編, シーエムシー出版, 第7章エコ未来型電池—バイオ電池, 316–324, 2005.

### 5. 3 学会等発表

#### 2003年度

電気化学会 電気化学会創立70周年記念大会 2003/04/1-3 (東工大・大岡山)

新規ヒスタミン脱水素酵素に関する電気化学的アプローチ

藤枝伸宇, ○加納健司, 池田篤治(京大院農)

ビリルビンオキシダーゼ/ヘキサシアノ鉄(II)酸イオンを用いたバイオカソードの基礎研究

○辻村清也, 中川貴晶, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

ヒドロゲナーゼ触媒電極反応による水素製造に関する考察

加藤 寛, 坂口誓也, 辻村清也, ○加納健司, 池田篤治(京大院農)

交流法によるグルコースセンシングへのマイクロ電極の効果

○高馬卓也, 桑畑 進, 長谷川英史, 加納健司, 中南貴裕(阪大院工, 京大院農, 松下電器くらし環境開発セ)

妨害物質除去法として有効な交流インピーダンス測定を用いたバイオセンシング

○桑畑 進, 長谷川英史, 加納健司(阪大院工, 京大院農)

東京農工大学 工学部・生命工学科 大野弘幸研究室 2003/07/17 (依頼講演)

バイオ電池の原理と展望

加納健司

The Second International Symposium on "Molecular Synchronization for Design of New Materials System" 2003/06/18-19 (Suzukake Hall in Tokyo Inst. of Tech. in Yokohama)

Bioelectrochemical Approach to Synchronized Glucose Metabolism of Microorganisms and Its Application

Kenji Kano, Tokuji Ikeda

XVIIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Firenze, Italy, 2003/06/19-24.

Quinoproteins as the Primary Enzymes and the Electron Transfer in Amine Metabolism of *Paracoccus denitrificans*

Kenji Kano, Nobutaka Fujieda, Ryo Nakayama, and Tokuji Ikeda

Bio-cathode Reactions in Bioelectrochemical Fuel Cells

Tokuji Ikeda, M. Kawaharada, T. Nakagawa, S. Tsujimura, Kenji Kano

高分子学会 03-3 ポリマーフロンティア 21 (依頼講演) 2003/09/16

生物の仕組みを利用するバイオ燃料電池への挑戦

加納健司

電気化学会 2003 年秋季大会 2003/09/11-12 北海道大学

無隔膜全電解法の創案と応用

栗山 淳, 新崎盛昭, 藤枝伸宇, 辻村清也, ○加納健司, 池田篤治(京大院農)

ビリルビンオキシダーゼの触媒活性と酸化還元電位の関係

○辻村清也, 栗山 淳, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

O<sub>2</sub>-4 電子還元のための酵素メディエータ修飾電極

○中川貴晶, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

複合酵素系コレステロールセンサ

○林 陽子, 嶋崎隆章, 加納健司, 池田篤治(ローム, 京大院農)

光・呼吸型電池の基礎的検討



- 林原正俊, 中川貴晶, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)  
キノヘモプロテインアミン脱水素酵素と電子受容体間相互作用に関する考察  
○中山 亮, 藤枝伸宇, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

分析化学会 2003/09/25 宮城教育大学

絶対微量定量を志向したフロー型酵素機能電極—ヒスタミンセンサーを例として—

- 向 勇一朗・加納健司・池田 篤治(京大院農)  
バイオ電池カソードのための酵素触媒酸素4電子還元反応の意義と反応解析  
○辻村清也・加納健司・池田篤治(京大院農)  
無隔膜バルク全電解法とその分光電気化学分析への応用  
○栗山 淳・新崎盛昭・辻村清也・藤枝伸宇・加納健司・池田篤治(京大院農)

電気化学会関西支部第43回電気化学セミナー 2003/11/19-20 京都リサーチパーク

バイオ燃料電池

- 加納健司

第49回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会 2003/11/22-23 山口大学工学部

無隔膜バルク全電解法とその分光電気化学分析への応用

- 栗山 淳, 新崎盛昭, 藤枝伸宇, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)  
酵素・メディエータ固定化カーボンフェルト電極を用いた酸素4電子還元反応解析  
中川貴晶, ○辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)  
酵素固定カーボン電極を用いたメディエータレス酸素4電子還元  
○中川貴晶, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)  
キノヘモプロテインアミン脱水素酵素と電子受容体間の電子移動反応  
○中山 亮, 藤枝伸宇, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

日本農芸化学会関西・中部合同支部大会 2003/10/4-5 京都(ば・る・るプラザ京都+京都大学)

キノヘモプロテインアミン脱水素酵素の構造と機能

- 佐藤敦子, 中山 亮, 藤枝伸宇, 加納健司, 池田篤治, 広津 建(大阪市大院理, 京大院農)  
新規ヒスタミン脱水素酵素の含有する酸化還元中心  
○藤枝伸宇, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治(京大院農, 大阪市大院理)  
糖・有機酸を燃料とするバイオ電池  
○辻村清也, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

第76回日本生化学学会大会 2003/10/15-18, パシフィコ横浜

新規ヒスタミン脱水素酵素の酸化還元中心

- 藤枝伸宇・加納健司・池田篤治(京大院農)  
Bioelectrochemical application of quino(hemo)proteins to biosensors and biofuel cells  
Kenji Kano and Tokuji Ikeda (シンポジウムオーガナイザー, 依頼講演)

Japan-Korea Mini-symposium on Food Enzyme Chemistry 2003/12/19 京大会館

Redox Properties of Quinoproteins and Their Application to Biosensors

- Kenji Kano and Tokuji Ikeda

第81回黒鉛化合物研究会 2004/01/28, 産総研関西センター, 池田

バイオ燃料電池における炭素電極  
加納健司

日本農芸化学会関西支部第 433 回講演会 2004/02/07, 京大会館

酵素-電極間直接電子移動系に関する考察

○辻村清也, 加納健司, 池田篤治 (京大院農)

電気化学会第 71 回大会 2004/03/24-26 慶應義塾大学

直接電子移動型酸素4電子還元バイオカソードの基礎検討

○辻村清也, 中川貴晶, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

バイオ電池アノードのためのNAD酵素系電極反応

新崎盛昭, 山中寛之, 佐藤 敦, ○加納健司, 池田篤治(京大院農)

2004 年度農芸化学会大会 2004/03/28-31 広島大学東広島キャンパス

アブシシン酸が有する電子親和性の生理活性における重要性

○堀内麻里・平井伸博・加納健司・大東 肇(京大院農)

新規ヒスタミン脱水素酵素の共有結合性コファクター

○藤枝伸宇, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治(京大院農・応生科)

新規グルコースデヒドロゲナーゼを用いた酸素不感応性血糖センサの基礎検討

○児島伸樹, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治, 佐藤美加, 真田浩一, 小村啓悟(池田食研)

新規ヒスタミン脱水素酵素の共有結合性コファクター

○藤枝伸宇, 佐藤敦子, 中山 亮, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

ヒスタミン脱水素酵素の発現系構築

○津瀬憲彰, 藤枝伸宇, 佐藤敦子, 中西晶子, 加納健司, 池田篤治(京大院農)

アルデヒドオキシダーゼを用いる電気化学アルデヒド定量の基礎検討

○越智大介、辻村清也、加納健司、池田篤治(京大院農)内田博之、山下綾子、上島孝之  
(福井大工・生応化)

## 2004年度

第 65 回分析化学討論会 2004/05/15-16 琉球大学千原キャンパス

酵素-電極間直接電子移動系に関する考察

○辻村清也, ○加納健司, 池田篤治

The 8th Word Congress on Biosensors 2004/05/24-26, Granada, Spain

Biosensors for total cholesterol in serum and its application to flow-type sensor tips

Yoko Hayashi<sup>1</sup>, T. Shimasaki<sup>1</sup>, H. Takasu<sup>1</sup>, Kenji Kano, Tokuji Ikeda (Rohm Co., Ltd.;  
Kyoto University)

Analysis of current-potential curves of enzyme-based direct electron transfer-type  
bioelectrocatalysis

Kenji Kano, Seiya Tsujimura, Tokuji Ikeda

Bioelectrochemical energy conversion systems based on mediated bioelectrocatalysis

Tokuji Ikeda, Seiya Tsujimura, and Kenji Kano

The 10th International Meeting on Chemical Sensor, 2004/07/11-14, Tsukuba

Kinetic study of direct electron transfer between enzyme and carbon electrodes

Seiya Tsujimura, Takaaki Nakagawa, Kano Kenji, and Tokuji Ikeda

Fundamental study for an oxygen-insensitive amperometric glucose sensor using a novel glucose dehydrogenase

Shinki Kojima, Seiya Tsujimura, Kenji Kano, Tokuji Ikeda, Mika Sato, Hirokazu Sanada, Hironori Omura

Amperometric cholesterol sensor with an oxidase/peroxidase bienzyme system

Yoko Hayashi, Takaaki Shimasaki, Hidemi Takasu, (Rohm Co., Ltd.), Kenji Kano, and Tokuji Ikeda. (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

International Conference for Analytical Surface Chemistry (Post Symposium of The 10th International Meeting on Chemical Sensor), 2004/07/15, Tsukuba

Bio-functional Electrode Reactions Aiming for Biofuel Cells

Kenji Kano, Seiya Tsujimura, and Tokuji Ikeda (Invited)

日本分析化学会第 53 年会 千葉工業大学, 2004/09/1-3

ヒスタミン脱水素酵素における電子移動特性

○藤枝伸宇, 加納健司, 池田篤治

新規グルコースデヒドロゲナーゼを用いた酸素不感応性血糖センサの基礎検討(2)

○辻村清也, 児島伸樹, 加納健司, 池田篤治

電極上に吸着した酵素及びその変異体の酸化還元挙動解析

○上高雄二, 辻村清也, 櫻井 武, 加納健司, 池田篤治

新規グルコースデヒドロゲナーゼを用いた酸素不感応性血糖センサの基礎検討(1)

○児島伸樹, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治, 佐藤美加, 眞田浩一, 小村啓悟

International Society of Electrochemistry – 55th Annual Meeting, 2004/09/19–24, Thessaloniki, Greece

Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water

Tokuji Ikeda, Seiya Tsujimura, Kenji Kano

Separator-less one-compartment bulk electrolysis and its application to spectroelectrochemistry

Kenji Kano, Atsushi Kuriyama, Seiya Tsujimura, Moriaki Arasaki, Nobutaka Fujieda, Tokuji Ikeda

日本農芸化学会創立80周年・関西支部創立70周年記念大会, 2004/10/2-3 日, びわ湖ホール・滋賀県立大学

NAD 依存性酵素を用いたバイオ電池の基礎検討

○石井章夫, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

大腸菌触媒によるグルコースおよび酢酸のメディエータ型電解酸化特性

○王永福, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

206th Meeting of The Electrochemical Society, Hawaii

Enzymatic biofuel cells using NAD-dependent dehydrogenase and bilirubin oxidase as electrocatalysts

Seiya Tsujimura, Kenji Kano, and Tokuji Ikeda

Direct Bioelectrocatalytic Behavior and Kinetic Analysis of Wild Type and Mutant Bilirubin Oxidases

Yuji Kamitaka, Seiya Tsujimura, Takeshi Sakurai, Kenji Kano and Tokuji Ikeda



日本生化学会第 77 回 パシフィコ横浜, 2004/10/13-16

Proposal for the Substrate Recognition Mode of Histamine Dehydrogenase Based on the Crystal Structure

Atsuko Satoh, Nobutaka Fujieda, Ryo Nakayama, Noriaki Tsuse, Kenji Kano and Tokuji Ikeda

Identification of Cofactors of Histamine Dehydrogenase

Nobutaka Fujieda, Atsuko Satoh, Noriaki Tsuse, Kenji Kano and Tokuji Ikeda

Purification and Biochemical Characterization of Recombinant Histamine Dehydrogenase

Noriaki Tsuse, Nobutaka Fujieda, Atsuko Satoh, Ryo Nakayama, Kenji Kano and Tokuji Ikeda

The 4th Joint Seminar on Development of Thermotolerant Microbial Resources and their Applications,  
November 2004/11/07-10, Kyushu University, Japan

Biological and Physicochemical Properties of the Cofactors of Histamine Dehydrogenase

Kenji Kano, Nobutaka Fujieda, Atsuko Satoh, Noriaki Tsuse, and Tokuji Ikeda

第 34 回電気化学講習会, 2004/11/16-17, 大阪大学中之島センター

触媒電極反応(酵素を中心に)ーバイオセンサ・バイオ電池への展開

加納健司

第 50 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会 京都大学, 2004/11/25-25

キノヘモプロテインアミン脱水素酵素の直接電子移動反応に関する一考察

○中山 亮, 上高雄二, 藤枝伸宇, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治

絶対微量定量を志向したフロー型酵素機能電極ーヒスタミンセンサーを例として

○向 勇一朗, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

NAD 依存性酵素を用いたバイオ電池の基礎検討

○石井章夫, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

酢酸菌を用いる生物電気化学エネルギー変換系についての基礎検討

○越智大介, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

ヒスタミン脱水素酵素の電子移動特性

○藤枝伸宇, 加納健司, 池田篤治

バイオクロメトリーによるグルコースの絶対定量

○児島伸樹, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

ビリルビンオキシダーゼ及びその変異体の酵素ー電極間直接電子移動反応

○上高雄二, 辻村清也, 櫻井 武<sup>1</sup>, 加納健司, 池田篤治(<sup>1</sup> 金沢大理)

大腸菌による酢酸のメディエータ型電解酸化特性

○王 永福, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

バイオ電池を志向した複合酵素系の Plastic Formed Carbon 電極への固定化

○長坂哲至, 辻村清也, 加納健司, 池田篤治

日本農芸化学会 2005 年度(平成 17 年度)大会 札幌コンベンションセンター, 2005/03/28-30

結晶構造から推定したヒスタミン脱水素酵素の基質認識部位への変異導入

○津瀬憲彰, 外山高継, 藤枝伸宇, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治

コファクター形成された組み換え体ヒスタミン脱水素酵素の発現

○藤枝伸宇, 津瀬憲彰, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治

構造解析によるヒスタミン脱水素酵素の基質認識機構解明へのアプローチ

○佐藤敦子, 藤枝伸宇, 中山 亮, 津瀬憲彰, 加納健司, 広津 建, 池田篤治

pH に依存したヒスタミン脱水素酵素の酸化還元挙動

○堤真衣子、藤枝伸宇、加納健司、池田篤治

NAD 依存性酵素を用いたバイオ電池の基礎検討

○石井 章夫、辻村 清也、加納 健司、池田 篤治

*Pseudomonas putida* 由来の新規不活性型キノヘモプロテインアミン脱水素酵素の特性評価

○中山 亮、佐藤敦子、藤枝伸宇、加納健司、池田篤治

日本化学会第 85 春季年会 神奈川大学, 2005/03/26-29

鉄-硫黄フラビンタンパク質ヒスタミン脱水素酵素の諸性質と結晶構造

○佐藤敦子、藤枝伸宇、中山 亮、津瀬憲彰、加納健司、池田篤治

## 2005年度

電気化学会第 72 回大会 熊本大学工学部, 2005/04/1-3

新規グルコースデヒドロゲナーゼを用いたクーロメトリによるグルコースの絶対定量

○辻村清也、児島伸樹、加納健司、池田篤治

ガス拡散バイオカソードにむけた基礎検討

○辻村清也、加納健司、池田篤治

日本農芸化学会関西支部例会(第 439 回講演会) 京都府立大学, 2005/06/4

ヒスタミン脱水素酵素の電子移動に及ぼす pH 効果

○堤真衣子、藤枝伸宇、加納健司、池田篤治

日本分析化学会第 54 年会 名古屋大学, 2005/09/14-16

電解による金属錯体修飾炭素電極の特性評価

辻村清也、片山彩、上高雄二、○加納健司(京大院農)

ヒスタミン脱水素酵素内における酸化還元中心間電子移動平衡の解析

○藤枝伸宇、堤真衣子、加納健司

第 4 回国際ビタミン学会 兵庫(淡路島), 2005/11

Substrate Recognition of Histamine Dehydrogenase from *Nocardioides simplex* Based on the Crystallographic Studies

Atsuko Satoh, Noriaki Tsuse, Maiko Tsutsumi, Nobutaka Fujieda, Ken Hirotsu and Kenji Kano

Recombinant Histamine Dehydrogenase: Purification, Biochemical Characterization and Mutational Analysis

Nobutaka Fujieda, Atsuko Satoh, Noriaki Tsuse, Maiko Tsutsumi and Kenji Kano

Purification and Characterization of a Novel Inactive-Form Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase from *Pseudomonas putida*

Ryo Nakayama, Atsuko Satoh, Nobutaka Fujieda, Ken Hirotsu and Kenji Kano

The 8th Asian Conference of Analytical Chemistry, Taipei, Taiwan (Invited), 2005/10/16-20

Fundamental Strategies for Biosensors and Biofuel Cells, and the Electrode Reaction Analysis

Kenji Kano and Seiya Tsujimura (Invited)

The 2nd International Symposium of Environmental Biotechnologies on Bioremediation, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, R.O.C. 2005/10/19-20



## Fundamental Aspects of Enzyme and Microbial Fuel Cells

Kenji Kano (Invited and Keynote Speech)

### 第 51 回ポーラログラフィーおよび電気分析化学討論会 中央大学(東京), 2005/11/25-27

メディエータ単層/多層型吸着酵素機能電極の作製

○石井章夫, 辻村清也, 加納健司

PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのメディエータ特性評価

○安保智彦, 辻村清也, 加納健司

FAD 依存性グルコースデヒドロゲナーゼとメディエータとの反応特性に関する一考察

○奥村典子, 安保智彦, 辻村清也, 加納健司

### 日本農芸化学会 2006 年度(平成 18 年度)大会 [京都] 京都女子大学, 2006/03/26-28

ヒスタミン脱水素酵素の基質認識部位への変異導入

津瀬憲彰, ○藤枝伸宇, 佐藤敦子, 加納健司, 池田篤治

ヒスタミン脱水素酵素を利用したヒスタミンの電気化学的検出

○山田龍介, 藤枝伸宇, 加納健司

分光電気化学的手法によるヒスタミン脱水素酵素の酸化還元挙動解析

○堤真衣子, 藤枝伸宇, 加納健司

バイオ電池カソード触媒への応用に向けたラッカーゼの特性評価

○石橋賢士, 上高雄二, 辻村清也, 加納健司

クエン酸回路の酵素を用いた多電子反応バイオ電池の基礎研究

○福田潤, 辻村清也, 加納健司

### 日本化学会 第 86 春季年会 (生物燃料電池の新展開) 2006/03/29

グルコース酸化触媒反応の課題

○加納健司

本研究の成果は上記, 原著論文, 総説, 単行本等として公表されている. これらの研究に関する論文を研究成果として以下にまとめた.